

## マウスにおける筋萎縮性側索硬化症の遺伝子治療実験に成功 — 孤発性筋萎縮性側索硬化症の根本治療へ向けた大きなステップ —

### 1. 発表者：

- 郭 伸 (国際医療福祉大学 臨床医学研究センター 特任教授/  
東京大学大学院医学系研究科附属疾患生命工学センター 臨床医工学部門  
客員研究員)
- 山下 雄也 (東京大学大学院医学系研究科附属疾患生命工学センター 臨床医工学部門  
特任研究員)

### 2. 発表のポイント：

- ◆死に至る難病であり、これまで治療法がなかった筋萎縮性側索硬化症 (ALS、注1) の発症原因に根ざした新規な根本治療法の開発に成功した。
- ◆モデルマウスにアデノ随伴ウイルス (注2) を静脈注射し神経細胞 (ニューロン) に遺伝子を導入することにより、孤発性 ALS で欠乏し細胞死の原因になっている蛋白質を正常化する治療法を開発・確立した。
- ◆ALS の大多数を占める孤発性 ALS の特異的遺伝子治療法として道を拓くものと期待される。

### 3. 発表概要：

筋萎縮性側索硬化症 (ALS) は主に中高年に発症する、進行性の筋力低下や筋萎縮を特徴とし、数年の内に呼吸筋麻痺により死に至る神経難病で、有効な治療法はありません。これまで、国際医療福祉大学臨床医学研究センター 郭 伸特任教授 (東京大学大学院医学系研究科附属疾患生命工学センター 臨床医工学部門 客員研究員) らの研究グループは、ADAR2 という酵素 (注3) が ALS の大多数を占める遺伝性のない孤発性 ALS の運動ニューロン死に関与していることを突き止めていました。

今回、郭特任教授と東京大学大学院医学系研究科附属疾患生命工学センター 臨床医工学部門 山下雄也特任研究員らの研究グループは、自治医科大学 村松慎一特命教授らと共同で、脳や脊髄のニューロンのみに ADAR2 遺伝子を発現させるアデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターを開発し、このベクターを孤発性 ALS の病態を示すモデルマウスの血管に投与したところ、その運動ニューロンの変性と脱落、および症状の進行を食い止めることに世界に先駆けて成功しました。

また、発症前のみならず発症後に投与した場合でも ADAR2 遺伝子を運動ニューロンに発現させることで死に至る一連の過程を止め、明らかな副作用を生ずることなく、運動ニューロン死による症状の進行が抑えられました。従来、静脈注射により脳や脊髄に遺伝子を導入することは困難とされていましたが、ニューロンのみで遺伝子を発現する AAV ベクターを用いることで、一度の静脈注射で効果的な量の ADAR2 遺伝子の発現を長期間持続させることができました。

モデルマウスでの結果ではありますが、孤発性 ALS 患者でも類似の分子メカニズムが働いていると想定され、今回用いたヒト型 ADAR2 に治療効果が得られたことから、同様の方法での遺伝子治療の有効性が期待できます。また、AAV ベクター自体の安全性は高いことが知

られており、今回の改良型 AAV ベクターの安全性を確認し、薬剤の効果が最も得られる用量などが明らかになれば、ALS の治療に道を拓くものと期待されます。

以上の成果は、「EMBO Molecular Medicine」（9月24日オンライン版）に掲載されました。なお、本研究は科学技術振興機構・戦略的研究推進事業（CREST）研究と厚生労働省・疾病障害者対策研究の支援を受けて行われました。

#### 4. 発表内容：

##### 【研究の背景】

国際医療福祉大学臨床医学研究センター 郭 伸特任教授（東京大学大学院医学系研究科 附属疾患生命工学センター 臨床医工学部門 客員研究員）の研究グループは、これまでの研究の積み重ねにより、ALS では神経伝達に関わるグルタミン酸受容体の一種である AMPA 受容体の異常が運動ニューロン死の原因であることを突き止めていました。具体的には、AMPA 受容体のカルシウム透過性を規定するサブユニットである GluA2 に本来生ずべき RNA 編集（転写後の一塩基置換）（注 5）が起こらず、未編集型 GluA2（注 6）が発現するためカルシウム透過性が異常に高い AMPA 受容体が運動ニューロンに発現していること、加えて、GluA2 が未編集となるのは RNA 編集酵素である ADAR2 酵素の発現低下のためであることを確かめていました（注 7）。さらに、ADAR2 のコンディショナルノックアウトマウス（AR2 マウス）（注 8）の解析から、ADAR2 酵素の発現低下は、異常なカルシウム透過性 AMPA 受容体の発現を引き起こすことにより運動ニューロン死の直接の原因であることを証明し、孤発性 ALS の運動ニューロンで起きる TDP-43 の局在異常（TDP-43 病理）（注 9）を引き起こすことから、この分子異常が孤発性 ALS に病因的意義を持つことを示してきました。

ALS には有効な治療法がなく、死に至る難病であるため、根本的な治療法が切望されています。ALS の遺伝子治療には脳幹や脊髄全体に治療遺伝子を送達させる必要があるため、静脈注射や髄腔内投与による遺伝子の送達が望まれます。しかし、投与した遺伝子は脳幹や脊髄にたどり着くまでに血液脳関門を通らなければならないため、効き目のある量を脳幹や脊髄で発現させることが困難でした。また、静脈注射や髄腔内投与では、遺伝子が目的とする運動ニューロンだけではなく全身に発現するため、目的とする脳幹や脊髄以外での遺伝子発現のため副作用を生ずる可能性が高く、両者を両立させることはこれまで課題となっていました。そこで、血管内に投与した場合でも脳や脊髄内の神経細胞（ニューロン）だけに遺伝子が発現するウイルスベクターを開発しました。このウイルスベクターに ADAR2 遺伝子を組み込み、孤発性 ALS の病態を示すモデルマウスの静脈に投与する遺伝子治療を行い、その効果を検討しました。

##### 【研究内容】

###### 1) 新規ウイルスベクターの開発

アデノ随伴ウイルス（AAV）はヒトの脳内投与、全身投与で安全に遺伝子を送達できるウイルスとして世界的にも遺伝子治療の臨床試験に用いられているウイルスです。今回、治療遺伝子を安全かつ効果的に ALS 患者の病症部位である脳幹や脊髄に届けることができる AAV ベクターを開発し、マウスの静脈内投与により約 20%以上の確率で脊髄運動ニューロンに治療遺伝子 ADAR2 を到達させ、発現させることに成功しました。遺伝子はニューロンだけに発現するため、肝臓や血液などの中枢神経のニューロン以外では発現せず、ADAR2 遺伝子が発現することによるニューロンやその周囲の組織の異常な反応も見られず、副作用も認められま

せんでした。そのため、ヒトでも安全に全身投与できる ADAR2 遺伝子ベクターであることが期待されます。

## 2) モデルマウスへの治療

孤発性 ALS の病態を示すコンディショナルノックアウトマウス (AR2 マウス) を既に関発しており、このモデルマウスでは、ALS に特有な運動機能障害、選択的な運動ニューロン死、ALS に特異的な TDP-43 病理が観察されることを明らかにしていました。このマウスに RNA 編集酵素 ADAR2 遺伝子を組み込んだ上記の AAV ベクターを投与し、遺伝子治療の効果を検討したところ、脊髄運動ニューロンへの遺伝子導入が確認され、モデルマウスへの投与から 2 か月で運動機能の低下が抑えられました。投与 7 ヶ月後のモデルマウスでは、ADAR2 遺伝子を組み込んだ AAV ベクターを投与していない対照群と比較して、脊髄の ADAR2 発現が 1.5 倍に上昇し、カルシウム透過性 AMPA 受容体の発現を意味する未編集型 GluA2 の発現が減り、脊髄前根 (注 10) の軸索数や運動ニューロンの細胞数の減少で表される運動ニューロンの変性や脱落が抑制されました。また、ALS に特有な TDP-43 の異常な局在変化が軽減され、核が TDP-43 陽性の正常な運動ニューロン細胞数が増加しました。上記の結果は、ADAR2 遺伝子の導入により ADAR2 活性が回復し、異常なカルシウム透過性 AMPA 受容体の発現が抑えられた結果、運動ニューロン死が阻止された事を意味しています。AAV ベクターを投与して ADAR2 遺伝子を発現させたことによる異常なグリア細胞の反応は見られませんでした。これらの解析結果は、孤発性 ALS 患者でも発現が低下している ADAR2 を正常化することで治療効果が得られる可能性があることを示唆します。

## 【社会的意義・今後の予定】

国際医療福祉大学臨床医学研究センター 郭 伸特任教授 (東京大学大学院医学系研究科 附属疾患生命工学センター 臨床医工学部門 客員研究員) の研究グループは、モデルマウスを用いて、死に至る神経難病である孤発性 ALS の特異的治療法の開発に成功しました。これまで ALS には根本的な治療法がなく、この遺伝子治療法の開発により ALS 患者の大多数を占める孤発性 ALS の治療実現への道筋が初めて拓かれたと言えます。この治療法は副作用や患者への治療行為への危険を軽減するために、血管内へウイルスベクターを投与し、脳や脊髄の神経細胞のみに治療遺伝子を発現させることを視野に入れた治療法で、一回の静脈注射で長期間の効果が得られる利点もあります。今回改良したウイルスベクターを用いれば脳や脊髄のニューロンに広範囲に治療遺伝子を導入できるようになるため、ALS 以外の中枢神経系疾患に対してもより簡便な遺伝子治療を提供できる可能性があります。今後、このウイルスベクターを用いた ADAR2 遺伝子導入の安全性の問題や効果が最も得られる用量などを解決することにより、人への応用が可能になり、ALS などの神経難病の治療法としての臨床応用が期待されます。

## 5. 発表雑誌:

雑誌名: 「EMBO Molecular Medicine」 (9月24日オンライン版)

論文タイトル: Rescue of amyotrophic lateral sclerosis phenotype in a mouse model by intravenous AAV9-ADAR2 delivery to motor neurons

著者: Takenari Yamashita, Hui Lin Chai, Sayaka Teramoto, Shoji Tsuji, Kuniko Shimazaki, Shin-ichi Muramatsu, Shin Kwak

DOI 番号: 10.1002/emmm.201302935

アブストラクト URL: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/emmm.201302935/abstract>

## 6. 問い合わせ先 :

郭 伸

国際医療福祉大学 臨床医学研究センター 特任教授／

東京大学大学院医学系研究科附属疾患生命工学センター 臨床医工学部門 客員研究員

電話/Fax : 03-5841-3566

e-mail : kwak-tky@umin.ac.jp

## 7. 用語解説 :

(注1) 筋萎縮性側索硬化症 (Amyotrophic Lateral Sclerosis ; ALS) :

運動ニューロン (大脳皮質運動野の上位運動ニューロンと脳幹脳神経核や脊髄前角の下位運動ニューロン) が変性、脱落することで起こる進行性の筋力低下や筋萎縮を特徴とする神経変性疾患である。主に中高年に発症し、有効な治療法はなく数年の内に呼吸筋麻痺により死に至る神経難病で、大多数は遺伝性のない孤発性 ALS である。本研究では孤発性 ALS を対象としている。

(注2) アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクター :

アデノ随伴ウイルス (adeno-associated virus) は、AAV と略称される病原性を持たない線状一本鎖の DNA ウイルス。DNA 組換え技術により、目的 (治療) 遺伝子を AAV ゲノムの両端に存在するヘアピン構造の間に挿入して、特定の細胞や組織で目的タンパク質を発現させるベクターとして利用されている。国内外の遺伝子治療の臨床研究に使用され、いったん組織や細胞に導入されれば、最低でも 5 年間以上は安定的に発現する。ウイルスベクターも物理的な安定性が高い。

(注3) ADAR2 (Adenosine deaminase acting on RNA 2) :

二重鎖 RNA のアデノシンに働く脱アミノ基酵素で、GluA2 Q/R 部位のアデノシンとイノシンの置換 (A-I 置換) を特異的に触媒する。この酵素がないと未編集型 GluA2 が発現し、AMPA 受容体はカルシウム透過性になる。

(注4) AMPA 受容体 :

ヒトや哺乳類の脳や脊髄で興奮性神経伝達を司る神経伝達物質であるグルタミン酸の受容体の一種で、イオンチャネルの開閉により神経の興奮を制御している。ほとんどのニューロンが AMPA 受容体を発現し、その大多数はカルシウムイオンを透過しない。孤発性 ALS では異常にカルシウム透過性が高い AMPA 受容体が発現している。

(注5) RNA 編集 (転写後の一塩基置換) :

遺伝子の DNA が RNA に転写された後、RNA 塩基に変化が起こることを総称して RNA 編集と呼び、この場合はアデノシンがイノシンに変換する脱アミノ基の反応 (A-I 置換) を指す。

(注6) 未編集型 GluA2 :

RNA 上のイノシンは翻訳時にグアノシンと認識されるので、ゲノム上のグルタミン (Q) コドン (CAG) が RNA 上で CIG に置換されアルギニン (R) コドン (CGG) として翻訳されるためにタンパク質においてアミノ酸置換が起こる。GluA2 の Q/R 部位はイオンチャネルポアの内腔に面しており、陽性電荷の R はカルシウムイオンの流入を妨げるが、中性電荷の Q

は妨げないので、GluA2はRNA編集によりカルシウムを制御する特性を獲得する。AMPA受容体の多くはGluA2を含み、そのGluA2は全て編集型なので、GluA2を含むAMPA受容体はカルシウム非透過性である。

(注7) ALS患者の剖検脊髄を用いた単一運動ニューロンの解析から、GluA2 Q/R部位のRNA編集が不十分で、未編集型GluA2が発現することが疾患特異的な病的変化であることを明らかにした(Ann Neurol, 1999; Nature 2004; Neurobiol Dis 2012)。

(注8) コンディショナルノックアウトマウス (AR2 マウス) : ADAR2 遺伝子の活性基部分を二個の Flox 配列ではさみ、運動ニューロン特異的に発現させた Cre により ADAR2 を運動ニューロンでノックアウトした (二個の Flox で挟まれた遺伝子部分は切り取られるため) マウスで、運動ニューロンでは未編集型 GluA2 が発現し、緩徐な運動ニューロン死による進行性運動麻痺を呈する、孤発性 ALS の表現型を再現する唯一の分子病態モデルマウスである (Hideyama et al., J Neurosci 2010)。

(注9) TAR DNA binding protein of 43 kDa (TDP-43) : TDP-43 は、RNA 結合タンパクで ALS の運動ニューロンに異常な物質の集積により形成される構造体 (封入体) の構成要素であることが 2006 年に明らかにされた。孤発性 ALS の大多数の症例やある種の家族性 ALS ではこの封入体と同時に正常な局在部位である核から TDP-43 の喪失が運動ニューロンに観察されるため (TDP-43 病理)、これは ALS の病理学的指標になっている。ADAR2 の発現低下は、カルシウム透過性 AMPA 受容体の異常な発現、カルシウム依存性プロテアーゼであるカルパインの活性化により TDP-43 病理の原因となるため (Yamashita et al, Nat Commun 2012)、運動ニューロンで TDP-43 病理が消失し、TDP-43 の正常な核内局在を取り戻すことは治療効果の指標になる。

(注10) 脊髄前根：脊髄のほぼ全長にわたって、脊髄の前面から出る脊髄神経の束。

## 8. 添付資料：

ホームページ：<http://square.umin.ac.jp/teamkwak/>

URL：<http://square.umin.ac.jp/teamkwak/yama/internal.html>

より、Internal only に下記の ID/PW を使って入り、報道関係者の方へ (平成 25 年 10 月分) の図 1、図 2 をご覧ください。

ID:teamkwak Password:ALS2013

図 1：AAV9-ADAR2 ウイルスを用いた ALS モデルマウスの治療。

孤発性 ALS の病態モデルマウスを用いて、ADAR2 遺伝子を組み込んだ AAV9 ベクターを経静脈的に投与することで運動ニューロンに ADAR2 遺伝子を導入した。その結果、マウスの運動症状および運動ニューロン死の進行が停止し、ALS 特異的病理変化である TDP-43 病理の正常化が確認された。この方法による孤発性 ALS の遺伝子治療の有効性を示す結果を得た。

図 2：AAV9-ADAR2 ウイルスを用いた ALS の治療戦略。

AAV9-ADAR2 を投与することにより、運動ニューロンの変性・脱落の原因となっている ADAR2 活性を正常化することで原因を取り除き、ALS 患者の症状として表れる、進行性の筋力低下、運動障害進行の阻止を目指す。